

姓名：\_\_\_\_\_郑若汐\_\_\_\_\_

中学：\_\_\_\_\_学军中学\_\_\_\_\_

省份：\_\_\_\_\_浙江省\_\_\_\_\_

国家/地区：\_\_\_\_\_中国\_\_\_\_\_

指导老师姓名：\_\_\_\_\_姚雨石\_\_\_\_\_

指导老师单位：\_\_\_\_\_浙江大学免疫研究所\_\_\_\_\_

论文题目：宿主与病毒的代谢-免疫博弈：ODR4 响应蛋氨酸代谢  
重塑调控抗病毒固有免疫应答

# 宿主与病毒的代谢-免疫博弈：ODR4 响应蛋氨酸代谢重塑调控 抗病毒固有免疫应答

郑若汐

## 摘要

甲型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 因其高度变异性, 易引发反复感染与季节性流行, 严重威胁公共卫生安全; 宿主与病毒的相互博弈受到机体营养代谢状态调控。IAV 感染可诱导宿主细胞发生代谢重塑, 促进病毒复制; 然而, 代谢产物的动态变化亦可作为反馈调节信号, 调控宿主固有免疫应答。本研究以人原代 II 型肺泡上皮细胞 (hpAT2EC) 和小鼠为模型, 结合代谢组学、蛋氨酸饮食干预、S-腺苷蛋氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 水平检测及 siRNA 干扰等技术, 探究宿主如何响应 IAV 感染诱导的代谢重塑, 进而调控抗病毒固有免疫应答。

结果显示, IAV 感染显著改变 hpAT2EC 细胞的整体代谢谱, 并导致蛋氨酸代谢通路活化及其核心代谢物 SAM 积累。小鼠实验表明, 低蛋白饮食可降低肺组织 SAM 水平, 减轻 IAV 感染导致的体重下降、肺组织损伤和病毒基因 *NS1* 的 mRNA 表达, 而在低蛋白饮食基础上补充蛋氨酸, 则可逆转其保护作用; 与之同时, 蛋氨酸限制性饮食 (methionine restriction diet, MRD) 可降低感染小鼠肺组织 SAM 水平, 减轻 IAV 感染相关损伤并抑制病毒基因表达。体外蛋氨酸限制培养同样可降低细胞内 SAM 水平和表达绿色荧光蛋白的甲型流感病毒 (IAV-GFP) 阳性细胞比例, 并增强固有免疫应答相关基因 *IFN- $\beta$*  和 *ISG15* 的表达。上述结果表明, 胞内 SAM 稳态参与调控甲型流感感染进程。

进一步通过转录组筛选和细胞实验发现, 外源 SAM 可诱导 odr-4 G 蛋白偶联受体定位因子同系物 (odr-4 GPCR localization factor homolog, ODR4) 的表达, 而下游代谢物 SAH 未产生相同作用; 抑制 SAM 合成则可显著减弱 IAV 感染诱导的 ODR4 上调。敲低 ODR4 后, IAV-GFP 阳性细胞比例增加, 并伴随 *IFN- $\beta$*  和 *ISG15* 表达下降。这些结果表明 ODR4 可响应 IAV 感染诱导的 SAM 累积而表达上调, 促进抗病毒固有免疫应答。

综上, 本研究发现 IAV 感染可引起蛋氨酸代谢重塑和 SAM 积累, 蛋氨酸限制能够在细胞和小鼠模型中抑制 IAV 感染。同时, ODR4 可能是连接 SAM 代谢变化与抗病毒固

有免疫应答的重要效应分子。本研究为理解营养代谢影响流感感染结局的机制，以及探索代谢靶向的膳食干预策略提供了实验依据。

**关键词：** 抗病毒固有免疫；甲型流感病毒；代谢重塑；S-腺苷蛋氨酸；ODR4；

## 缩略词表

|         |                                                          |                                  |
|---------|----------------------------------------------------------|----------------------------------|
| IAV     | Influenza A virus                                        | 甲型流感病毒                           |
| SAM     | S-adenosylmethionine                                     | S-腺苷蛋氨酸                          |
| SAH     | S-adenosyl-L-homocysteine                                | S-腺苷同型半胱氨酸                       |
| ODR4    | <i>odr-4</i> GPCR localization factor homolog            | <i>odr-4</i> G 蛋白偶联受体<br>定位因子同系物 |
| GPCR    | G Protein-Coupled Receptors                              | G 蛋白偶联受体                         |
| IFN-I   | Type I Interferons                                       | I 型干扰素                           |
| TLRs    | Toll-like receptors                                      | Toll 样受体                         |
| RLRs    | Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like<br>receptors | RIG-I 样受体                        |
| ISGs    | Interferon-Stimulated Genes                              | 干扰素刺激基因                          |
| hpAT2EC | Human primary type II alveolar epithelial<br>cells       | 人原代II型肺泡上皮细胞                     |
| UFM1    | Ubiquitin Fold Modifier-1                                | 泛素折叠修饰因子-1                       |
| CD      | Chow Diet                                                | 对照饲料                             |
| LPD     | Low-protein diet                                         | 低蛋白饲料                            |
| MRD     | Methionine restriction diet                              | 蛋氨酸限制性饲料                         |
| Met     | Methionine                                               | 蛋氨酸                              |
| Phe     | Phenylalanine                                            | 苯丙氨酸                             |
| Thr     | Threonine                                                | 苏氨酸                              |
| ELISA   | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                        | 酶联免疫吸附测定                         |
| qPCR    | Quantitative Polymerase Chain Reaction                   | 荧光定量 PCR                         |
| H&E     | Hematoxylin and eosin (H&E) stains                       | 苏木精和伊红染色                         |
| GFP     | Green Fluorescent Protein                                | 绿色荧光蛋白                           |
| MOI     | Multiplicity of infection                                | 感染复数                             |
| DMSO    | Dimethyl sulfoxide                                       | 二甲基亚砜                            |
| PFU     | Plaque Forming Unit                                      | 病毒空斑形成单位                         |

## 目录

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 摘要 .....                                                                 | 2  |
| 缩略词表 .....                                                               | 4  |
| 1.研究背景 .....                                                             | 6  |
| 1.1 流感防控形势日趋严峻，营养代谢靶向干预为流感防治提供新视角 .....                                  | 6  |
| 1.2 固有免疫是机体抗流感的核心防线，营养代谢调控免疫应答的研究日趋深入 .....                              | 6  |
| 1.3 蛋氨酸代谢核心产物 SAM 异常累积，是调控流感感染结局的关键风险因子 .....                            | 7  |
| 1.4 ODR4 作为响应 SAM 代谢波动的关键效应分子，参与调控宿主抗病毒免疫应答 .....                        | 8  |
| 2.材料与方法 .....                                                            | 9  |
| 2.1 实验动物和试剂 .....                                                        | 9  |
| 2.2 饮食干预 IAV 感染小鼠 .....                                                  | 9  |
| 2.3 细胞系与培养条件 .....                                                       | 11 |
| 2.4 IAV-GFP 病毒感染 .....                                                   | 11 |
| 2.5 流式细胞术 .....                                                          | 11 |
| 2.6 荧光显微镜观察 .....                                                        | 11 |
| 2.7 酶联免疫吸附测定（ELISA）检测 SAM 水平 .....                                       | 12 |
| 2.8 细胞 siRNA 干扰 .....                                                    | 12 |
| 2.9 蛋白提取与免疫印迹分析 .....                                                    | 13 |
| 2.10 RNA 提取与荧光定量 PCR（Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR） ..... | 14 |
| 2.11 代谢组学分析 .....                                                        | 15 |
| 2.12 数据量化与统计分析 .....                                                     | 15 |
| 3.结果 .....                                                               | 16 |
| 3.1 蛋氨酸代谢通路在甲流病毒感染过程中活化 .....                                            | 16 |
| 3.2 蛋氨酸调控 IAV 感染 .....                                                   | 18 |
| 3.3 蛋氨酸限制抑制 IAV 感染 .....                                                 | 20 |
| 3.4 ODR4 响应 SAM 水平波动表达上调 .....                                           | 23 |
| 3.5 ODR4 抑制病毒感染并促进抗病毒免疫应答 .....                                          | 25 |
| 4.讨论 .....                                                               | 27 |
| 5.参考文献 .....                                                             | 29 |
| 6.致谢 .....                                                               | 31 |

## 1.研究背景

### 1.1 流感防控形势日趋严峻，营养代谢靶向干预为流感防治提供新视角

甲型流感病毒（Influenza A virus, IAV）具有高频突变特性，易造成季节性流行及大规模传播，长期严重威胁人类公共卫生安全。据相关估计，2009 年甲型流感大流行在全球造成广泛感染，并导致约 50 万人死亡<sup>[1]</sup>。据相关监测报道，2025 年初国内流感疫情有所回升，南、北方省份流感样病例就诊占比分别达 7.2% 和 7.5%，其中甲型流感占比超过 90%<sup>[2]</sup>。IAV 主要通过识别呼吸道及肺泡上皮细胞表面唾液酸受体侵入宿主，破坏呼吸道上皮屏障，诱发炎症浸润与急性肺损伤，重症感染可进一步引发急性呼吸窘迫综合征、多器官衰竭，最终导致患者死亡<sup>[3]</sup>。目前临床针对 IAV 的防控手段，以疫苗接种与靶向病毒蛋白的抗病毒药物为主，但 IAV 基因组持续变异，不仅会削弱疫苗保护效力，还易诱导耐药毒株产生<sup>[4]</sup>。此时，营养免疫学研究的发展为流感防治提供了新的思路。已有研究表明，机体营养代谢稳态可影响调控宿主与流感病毒的相互作用，进而调控病毒感染易感性与疾病进展进程<sup>[5]</sup>。膳食纤维与生酮饮食可通过调控机体免疫应答，展现出抗流感病毒的干预潜力<sup>[6-7]</sup>。补充维生素、矿物质等膳食干预方式也可有效调控流感感染病程、改善感染预后<sup>[8]</sup>。因此，解析病毒感染过程中宿主代谢重塑及其如何调控宿主与病原体的博弈结局，可为开发代谢靶向和营养干预策略提供理论依据。

### 1.2 固有免疫是机体抗流感的核心防线，营养代谢调控固有免疫应答的研究日趋深入

I 型干扰素（IFN-I）是机体抗流感固有免疫应答的核心效应介质，当病毒感染机体时，宿主模式识别受体 Toll 样受体（TLRs）与 RIG-I 样受体（RLRs）可特异性识别流感病毒 RNA，活化 IRF3 等信号分子，诱导 I 型干扰素大量合成。干扰素通过 JAK-STAT 信号通路上调干扰素诱导基因（ISGs）的表达，广泛抑制病毒感染与复制，构建机体抗病毒屏障<sup>[9]</sup>。目前临床也常采用 I 型干扰素雾化疗法治疗病毒性肺炎（如流感和新冠病毒感染）<sup>[10]</sup>。然而，一些病毒包括流感病毒通过影响宿主 I 型干扰素的产生及其应答过程抑制宿主免疫，实现免疫逃逸<sup>[11]</sup>。

氨基酸是机体蛋白质合成的基本原料，也是维系细胞代谢、调控机体免疫稳态的关键物质基础<sup>[12]</sup>。其中，必需氨基酸无法在人体内自主合成，依靠膳食摄取，是保障机体正常生命活动、维持免疫防御功能的核心营养组分。对于病毒感染过程而言，氨基酸既是病毒

合成子代蛋白的原料，同时也作为信号分子，参与调控抗病毒免疫信号通路与抗病毒效应分子的合成<sup>[12]</sup>。已有研究，新型冠状病毒等多种病毒感染均会诱发宿主氨基酸代谢紊乱，且代谢异常程度与感染康复进程密切相关<sup>[13]</sup>。在病毒与宿主的博弈过程中，氨基酸代谢发挥双向作用：一方面，病毒劫持宿主氨基酸代谢通路，满足自身增殖的物质与能量需求<sup>[14]</sup>；另一方面，氨基酸代谢产物能够调控机体抗病毒免疫应答。例如，病毒感染过程中精氨酸代谢产生的精胺、亚精胺会抑制 I 型干扰素生成<sup>[15]</sup>；而酪氨酸代谢产物 4-羟基苯丙酸则能够增强干扰素信号通路，提升抗病毒能力<sup>[16]</sup>。这些研究提示，氨基酸代谢是宿主与病毒博弈过程中的重要调控环节。

氨基酸代谢水平与膳食摄入模式密切相关。有文献认为低蛋白膳食可能有益于病毒感染预后，但该推论仍有待进一步验证<sup>[17]</sup>。UK Biobank 流行病学研究同样观察到，过量摄入富含蛋氨酸的红肉，会显著升高人群呼吸道感染风险<sup>[18]</sup>。上述研究提示，病毒感染相关的氨基酸代谢重塑并非单纯的感染伴随性变化，而是连接机体营养状态、固有免疫应答与疾病结局的调控因素<sup>[12]</sup>。因此，有必要深入研究 IAV 感染如何重塑氨基酸代谢网络，以及宿主如何响应代谢波动并调控抗病毒免疫应答。这样的研究有助于揭示宿主与病毒相互博弈的内在本质，也可为膳食营养干预调节宿主免疫状态、调控流感感染病程提供了实验依据。

1.3 蛋氨酸代谢核心产物 SAM 参与调控流感感染结局

为系统解析 IAV 感染时宿主氨基酸代谢规律，本研究以人原代肺泡 II 型上皮细胞（hpAT2EC）为模型，构建 IAV（PR8 株）体外感染模型并开展代谢组学检测。初步观察到，IAV 感染可显著激活宿主蛋氨酸代谢通路，导致通路核心产物 S-腺苷蛋氨酸（SAM）胞内水平升高。蛋氨酸为人体必需膳食氨基酸，可在蛋氨酸腺苷转移酶催化下生成 SAM；SAM 是机体核心甲基供体，广泛参与蛋白修饰、表观遗传调控等多种生命过程（图 1）<sup>[19]</sup>。

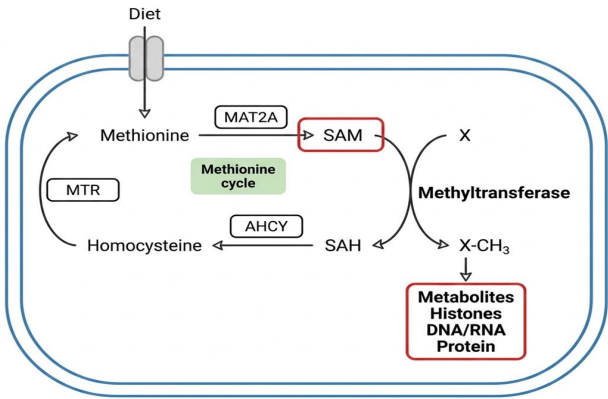


图 1. 蛋氨酸代谢通路

已有研究提示，SAM 参与病毒核酸的甲基化修饰，增强核酸稳定性并有利于 IAV 等病毒复制<sup>[20-21]</sup>；与此同时，细胞内过度累积的 SAM 介导干扰素通路关键蛋白甲基化修饰，抑制固有免疫应答<sup>[22-23]</sup>。本研究前期实验观察到，补充蛋氨酸导致 SAM 升高并加重流感感染损伤；而蛋氨酸限制可下调 SAM 水平，激活抗病毒固有免疫应答，有效抑制 IAV 感染。上述结果表明，SAM 稳态参与流感感染转归。

1.4 ODR4 响应 SAM 代谢波动并参与宿主抗病毒免疫应答

机体如何感知病毒感染引发的 SAM 稳态失衡并调控抗病毒免疫应答？为了回答这一问题，本研究首先对 SAM 处理的细胞开展转录组测序，发现 odr-4 G 蛋白偶联受体定位因子同系物（odr-4 GPCR localization factor homolog, ODR4）基因上调最为明显。而 IAV 感染亦可显著诱导 ODR4 表达上调。ODR4 是一种高度保守的内质网膜蛋白，参与 G 蛋白偶联受体（GPCR）的折叠、成熟与胞内转运，维持细胞信号转导稳态<sup>[24]</sup>。已有研究表明，GPCR 及其下游 G 蛋白信号可直接调控宿主的抗病毒固有免疫应答<sup>[25]</sup>。此外，ODR4 可特异性结合 de-UFMylation 酶 UFSP2，并将其锚定在内质网膜上，维持内质网 UFM1 修饰动态平衡<sup>[26]</sup>。UFM1 修饰可调控 RIG-I 等干扰素通路核心分子的活性，调控抗病毒免疫应答<sup>[27]</sup>。但 ODR4 是否参与抗病毒免疫应答，目前尚不明确。本研究发现，干扰 ODR4 的表达可抑制 *IFN-β* 和 *ISG15* 等固有免疫应答相关基因的表达，促进 IAV 感染，提示 ODR4 是连接蛋氨酸代谢与宿主抗病毒免疫的效应分子。

综上，本研究初步揭示，在甲流病毒与宿主的相互博弈过程中，甲型流感病毒活化蛋氨酸通路，并利用其核心代谢物 SAM 蓄积为自身复制提供有利条件；与此同时，宿主可响应病毒感染引发的 SAM 代谢紊乱，上调 ODR4 表达，促进抗病毒免疫防御，进而抑制病毒感染（图 2）。本研究也初步证实蛋氨酸限制这一营养干预策略对流感具有保护作用，为甲型流感的营养膳食干预方案提供了实验依据。

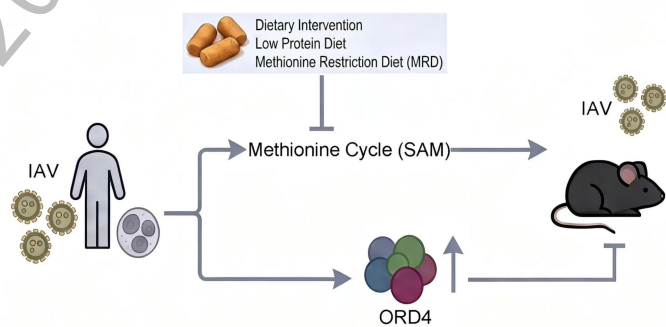


图 2. SAM-ODR4：甲型流感病毒与宿主细胞的博弈

## 2.材料与方法

### 2.1 实验动物和试剂

动物实验伦理：所有动物实验均严格按照《实验室动物饲养和使用指南》（国家标准）及浙江大学实验动物管理相关规定执行，实验方案详细列明实验动物的使用数量、品系、处理方式、安乐死流程等内容，经浙江大学实验动物饲养与使用伦理委员会（IACUC）全面审核通过（No.ZJU20250065）。实验过程中尽量减少动物痛苦，严格控制实验操作的规范性，遵循 3R 原则（替代、减少、优化），确保动物实验的科学性与伦理性。

#### 实验动物品系与主要试剂来源：

C57BL/6J 小鼠：购自上海斯莱克实验动物有限公司，动物许可证号：SCXK（沪）2023-0001，购回后适应性饲养 1 周，确认无异常后用于实验。

小鼠饲养条件：所有小鼠均饲养于浙江大学实验动物中心无特定病原体级动物房内，饲养环境参数：温度 22-25℃，湿度 50%-60%，光照周期为 12 hrs 光照/12 hrs 黑暗，自由饮用无菌去离子水，饲喂无菌标准啮齿类饲料。实验用小鼠选择：所有动物实验均选用 6-8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠，体重 18-20g，随机分组。

主要试剂：AG-270（MCE，HY-138630），S-Adenosylmethionine (SAM)（MCE, HY-B0617），S-Adenosylhomocysteine (SAH)（MCE，HY-19528）TRIzol reagent（Accurate Biology, AG21102），SYBR GreenMix（Accurate Biology，AG11701），ODR4 抗体（Target Mol, TMAB-09752），GAPDH 抗体（Protein tech，60004-1-Ig），L-Phenylalanine（MCE, HY-N0215），L-Threonine（MCE, HY-N0658），Low-protein Rodent Diet (LPD) (Shanghai BoPai, M21083104). Control Diet (Shanghai BoPai, M20121704), L-Amino Acid Rodent Diet with 0.17% Methionine (MRD) (Shanghai BoPai, M22121202)，L-Methionine (MCE, HY-N0326),Methionine restriction Medium (Pro cell, PM150143)。

### 2.2 饮食干预 IAV 感染小鼠

#### 2.2.1 IAV 感染小鼠模型建立

对照组正常饮食（CD 组）：饲喂含 21%的 L-氨基酸啮齿类对照饲料（含 0.85%的蛋氨酸）；

低蛋白饮食喂养组（LPD 组）：饲喂含 7%的 L-氨基酸啮齿类饲料，自由采食、饮水。

低蛋白饮食喂养并分别回补必需氨基酸：

LPD+Met 组:饲喂含 7%的 L-氨基酸啮齿类饲料并回补蛋氨酸 (Met, 4.6 g/kg) ;

LPD+Phe 组:饲喂含 7%的 L-氨基酸啮齿类饲料并回补苯丙氨酸 (Phe, 4.8 g/kg) ;

LPD+Thr 组:饲喂含 7%的 L-氨基酸啮齿类饲料并回补苏氨酸 (Thr, 6.7 g/kg) ;

蛋氨酸限制组 (MRD 组) : 饲喂含 0.17%蛋氨酸的 L-氨基酸啮齿类蛋氨酸限制饲料;  
所有组别小鼠均自由采食、饮水。

饲料喂养时间节点为感染后治疗: 小鼠先饲喂标准对照饲料, 感染后第 2 天 (2 dpi) 开始更换为相应饲料, 持续饲喂至实验结束。IAV 感染小鼠模型构建如下: (1) 病毒制备: 从-80℃冰箱中取出 IAV 病毒储备液, 冰上融化后用无菌 PBS 稀释至 300 PFU/25  $\mu$ L, 现配现用。(2) 小鼠麻醉: 经腹腔注射 10%水合氯醛 (300mg/kg) 麻醉, 当小鼠呼吸平稳、角膜反射消失、肢体松弛时, 表明麻醉成功, 取出小鼠, 仰卧固定于小鼠手术台上。(3) 鼻内接种: 用无菌微量移液器吸取 25  $\mu$ L 稀释后的 IAV 病毒液(每只小鼠接种 300 PFU 病毒), 缓慢滴入小鼠单侧鼻腔, 滴入后轻轻按压小鼠胸廓, 使病毒液充分进入小鼠肺部, 避免病毒液溢出; 接种完成后, 将小鼠置于温暖环境中, 待小鼠苏醒 (约 10-15 min) 后, 放回饲养笼中。对照组: 接种 25  $\mu$ L 无菌 PBS, 接种方式与病毒感染组一致, 用于排除麻醉、接种操作对小鼠的影响。

检测指标:

(1) 体重与存活率监测: 感染后连续观察 14 天, 每天定时称量每只小鼠的体重, 记录体重变化 (以感染当天体重为初始体重, 计算体重变化百分比); 同时观察小鼠的存活情况, 记录死亡小鼠的死亡时间, 绘制体重变化曲线和存活率曲线。

(2) 样本收集: 感染后 5 天 (急性期), 经腹腔注射 10%水合氯醛 (300 mg/kg) 麻醉后, 仰卧位固定, 逐层解剖暴露胸腔, 处死后收集小鼠的肺组织, 检测小鼠体内 SAM 水平, 病毒感染程度与肺组织损伤。

### 2.2.2 HE 染色和免疫组化染色

感染小鼠完整肺组织, 用无菌生理盐水冲洗表面血迹, 滤纸吸干水分。取右下肺组织, 立即放入 4%多聚甲醛固定液中, 固定体积为组织体积的 10 倍以上, 室温固定 24-48 hrs, 固定期间避免组织挤压。随后将固定好的组织送至浩克生物技术有限公司进行包埋切片与 HE 染色和 ODR4 抗体免疫组化染色。染色后用显微镜观察。

### 2.2.3 病理评分

每张小鼠肺组织 HE 染色片子选取 5~10 个视野，由病理专家采用肺组织病理评分标准（ATS）进行盲法阅片，统计各视野评分并计算平均值。

### 2.3 细胞系与培养条件

细胞系来源：人原代 II 型肺泡上皮细胞（hpAT2EC）由浙江大学于晓方教授课题组提供，用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养细胞，放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养；细胞贴壁并恢复约 12 hrs 后用于后续实验。

### 2.4 IAV-GFP 病毒感染

IAV（PR8）和 IAV-GFP（PR8）流感病毒由哈尔滨兽医研究所惠赠。GFP 报告基因插入 NS 片段（NS1-GFP），不影响病毒复制但随病毒感染表达 GFP。人原代肺泡 II 型上皮细胞（hpAT2EC）， $1 \times 10^5$ /孔密度接种于 24 孔培养板中，待细胞融合度达 70%~80% 时进行感染。感染前弃去原培养液，用预温 PBS 轻柔洗涤细胞 2 次；按感染复数（MOI）为 1 加入稀释的 IAV-GFP 病毒液。将细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中吸附 1 hr。吸附结束后弃去病毒接种液，PBS 洗涤 1 次，更换为含 2% FBS 的培养基，继续于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。分别于感染后 0、4、8 hrs 收集细胞，用于后续流式细胞术检测或荧光显微镜观察。

### 2.5 流式细胞术

IAV-GFP 感染后收集细胞。弃去培养液，PBS 洗涤 1 次，加入 100  $\mu$ L 胰酶-EDTA 进行消化，消化至细胞变圆脱落，立即加入含 2% FBS 的 DMEM 终止消化。1000 r/min 离心 5 min，弃上清，PBS 重悬细胞沉淀，再次离心洗涤。最终将细胞重悬于 300  $\mu$ L 预冷的 PBS 中。使用流式细胞仪进行检测，收集绿色荧光信号。每管至少采集 10000 个细胞事件。以对照组细胞的荧光信号设定 GFP 阳性门阈值，分别统计各时间点或不同处理的 hpAT2EC 细胞 GFP 阳性率。数据采用 FlowJo 软件进行分析。

### 2.6 荧光显微镜观察

将 hpAT2EC 接种于预置无菌盖玻片的 24 孔板中，按 2.4 所述方法以 IAV-GFP 感染细

胞，于各时间点将细胞置于荧光显微镜下观察，随机选取多个视野采集图像。

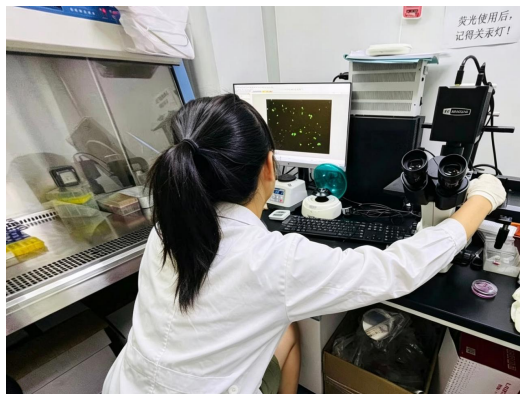


图 3. 荧光显微镜观察 IAV-GFP 感染细胞

## 2.7 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测 SAM 水平

### (1) 细胞水平

收集细胞沉淀，向细胞沉淀中加入 200  $\mu\text{L}$  预冷的细胞裂解液，涡旋重悬后反复冻融 3 次裂解，裂解后于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 15 min，吸取上清即为细胞内 SAM 待测样本。采用 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) ELISA 试剂盒 (江莱生物) 进行检测，严格按说明书操作：①将 SAM 标准品用样本稀释液倍比稀释为系列浓度标准品，向预包被 SAM 特异性抗体的 96 孔板中分别加入标准品及待测样本各 50  $\mu\text{L}$ ；②再加入 HRP 标记的结合液 50  $\mu\text{L}$ ，振荡混匀后封板，37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 60 min；③弃去孔内液体，以洗涤液 300  $\mu\text{L}$  洗板 5 次并拍干；④每孔先后加入反应液 A 液：B 液 (1: 1) 各 50  $\mu\text{L}$ ，37  $^{\circ}\text{C}$  避光显色 15 min；⑤随后加入终止液 50  $\mu\text{L}$ ，于 15 min 内在酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度。

### (2) 小鼠肺组织水平

随机选取流感模型小鼠，取出全肺，预冷 PBS 冲洗后滤纸吸干称重，取 0.05g 肺组织加入含 1 mL 的预冷 PBS，冰水浴机械匀浆至无肉眼可见组织块，4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 15 min，取上清即为肺组织匀浆待测样本。肺组织样本经稀释 5 倍后加样，其余配制、加样、孵育、洗板、显色、终止及读数步骤均与细胞水平的 SAM 检测一致。

## 2.8 细胞 siRNA 干扰

将 hpAT2EC 细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中常规培养至对数生长期。消化细胞后计数，按  $2 \times 10^5$  个细胞/孔的密度接种于 12 孔板，加入 500  $\mu\text{L}$  完全培养基。置于  $\text{CO}_2$  培养箱中过

夜培养，待细胞融合度达到约 50% 时进行转染干扰。ODR4 干扰序列为: Sense (5'-3') GCAGAUUGGAAGUAUCAAGU, Antisense (5'-3')-UUUGAUACUCCAAUCUGCUG。准备 Opti-MEM 无血清培养基与 INTERFERIN (Polyplus, Sartorius) 转染试剂，按照试剂说明书配置转染体系（表 2）：

表 2 转染体系

| 试剂               | 体积          |
|------------------|-------------|
| Opti-MEM         | 50 $\mu$ L  |
| INTERFERIN       | 1 $\mu$ L   |
| 20 $\mu$ M siRNA | 0.5 $\mu$ L |

配制步骤：

取 1.5 mL 无菌 EP 管，先加入 50  $\mu$ L Opti-MEM，再加入 1  $\mu$ L INTERFERIN 试剂，轻轻混匀，向上述混合液中加入 0.5  $\mu$ L 20  $\mu$ M siRNA（使 siRNA 终浓度为 20 nM），轻轻吹打混匀，室温静置 20 min。将配制好的 siRNA-转染试剂复合物逐滴加入对应孔中，轻轻摇晃混匀。将孔板放回 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中，继续培养 24-36 hrs。提取细胞总 RNA/蛋白，通过 RT-PCR 或 Western Blot 检测基因的表达水平。敲降成功的细胞用于后续实验。

## 2.9 蛋白提取与免疫印迹分析

对于细胞总蛋白提取，收集约  $1 \times 10^6$  个细胞，直接加入适量 1×SDS 上样缓冲液（含  $\beta$ -巯基乙醇）裂解，并于 99°C 金属浴变性 10 min。蛋白样品通过 10%-15% 的梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，然后使用湿转法或半干转法将蛋白转移至 0.45  $\mu$ m 孔径的硝酸纤维素膜（Millipore）上。转膜条件通常为：恒流 330 mA，根据目的蛋白大小调整时间（1-2 hrs）。

转膜后用含 5% BSA 的 TBST 缓冲液室温封闭 1 hr，以阻断非特异性结合位点。随后与稀释于封闭液中的一抗 4°C 孵育过夜。一抗稀释比例分别为：anti-GAPDH (1:5000)，anti-ODR4 (1:2500)。次日，TBST 洗膜三次，每次 10 min，然后与辣根过氧化物酶（HRP）标记（1:5000）的二抗室温孵育 1 hr。再次 TBST 洗膜三次。蛋白信号检测：HRP 标记的二抗使用化学发光底物孵育后，通过凝胶成像系统曝光成像。

## 2.10 RNA 提取与荧光定量 PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

使用 TRIzol 试剂 (Accurate Biology) 按照制造商说明书提取小鼠肺组织 (约 20 mg) 或培养细胞 (约  $1 \times 10^6$  个) 的总 RNA。组织样本需在液氮中充分研磨后再加入 TRIzol。使用 PrimeScript RT Reagent Kit (Takara) 将提取的总 RNA 逆转录为互补 DNA (cDNA), 反应体系及条件严格按试剂盒说明书进行。定量 PCR 使用 SYBR Green Pro Taq HS Mix (Accurate Biology) 在 CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) 上进行。反应程序通常为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 40 个循环的  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火延伸 30 s。熔解曲线分析用于验证扩增产物的特异性。目的基因的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算。以  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 作为小鼠组织的内参基因, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为 hpAT2EC 的内参基因。所用引物序列见表 3。

表 3 qPCR 引物序列表

| 基因                    | 引物序列 (5'-3')          |
|-----------------------|-----------------------|
| human- <i>ODR4-F</i>  | GATCCACAGCCACAGTCCAG  |
| human- <i>ODR4-R</i>  | AAGGGAGGACGTGGAAGTCT  |
| Human <i>IFNB-F</i>   | CCTACAAAGAAGCAGCAA    |
| Human <i>IFNB-R</i>   | TCCTCAGGGATGTCAAAG    |
| Human <i>ISG15-F</i>  | CGCAGATCACCCAGAAGATCG |
| Human <i>ISG15-R</i>  | TTCGTCGCATTTGTCCACCA  |
| Human <i>GAPDH-F</i>  | CGGAGTCAACGGATTTGGTC  |
| Human <i>GAPDH-R</i>  | GACAAGCTTCCC GTTCTCAG |
| <i>NP-F</i>           | CTAGCACGGTCTGCACTCAT  |
| <i>NP-R</i>           | TCAAAGTCGTACCCACTGGC  |
| <i>NSI-F</i>          | GTCAAGCTTTCAGGTAGATTG |
| <i>NSI-R</i>          | CTCTTAGGGATTTCTGATCTC |
| Mouse <i>actin -F</i> | AACAGTCCGCCTAGAAGCAC  |
| Mouse <i>actin -R</i> | CGTTGACATCCGTAAAGACC  |



图 4. 荧光定量 PCR 实验

### 2.11 代谢组学分析

为分析病毒感染对细胞代谢谱的影响，将 hpAT2EC 细胞接种于 6 孔板（约 70% 融合度），用 IAV 病毒（MOI=1）感染 8 hrs。迅速取出培养板，立即弃去孔内含病毒的培养基，随后用预热至 37°C 的 PBS 缓冲液（pH=7.4）轻轻洗涤细胞（避免由于温度差异导致的代谢变化）。洗涤完成后弃尽剩余 PBS，立即将整个培养板放入液氮中快速淬灭细胞，防止细胞内代谢物发生降解或转化，确保细胞代谢完全停滞。

每孔加入 1 mL 预冷至 -20°C 的 60% 质谱纯甲醇溶液，以无菌细胞刮收集细胞裂解物并转移至 1.5 mL 无菌无酶离心管，样本经液氮冻融-剧烈涡旋循环 5 次充分裂解细胞、释放胞内代谢物后，于 4°C、12000 r/min 离心 15 min，小心吸取上层清亮上清液，样本送至联川生物进行代谢组质谱检测 and 数据分析。实验设置 4 个生物学重复。同时设置未感染病毒的空白对照组。

### 2.12 数据量化与统计分析

所有实验数据的统计分析均采用 GraphPad Prism 9 软件完成；图像分析使用 ImageJ 软件（Fiji 版本，[https://imagej.nih.gov/ij/](#)）；代谢物主成分分析（PCA）及代谢通路富集分析依托 MetaboAnalyst 6.0 在线平台（[https://www.metaboanalyst.ca/](#)）开展；差异代谢物的火山图与热图绘制基于联川云平台（[https://www.lianchuan.com/](#)）；除非图例另有说明，数据均以均值±标准差（mean ± SD）表示。两组间比较采用双尾 Student's t 检验；多组间比较采用单因素或双因素方差分析（ANOVA），并进行适当的事后检验（如 Tukey 校正），生存曲线分析采用 Kaplan-Meier 法并进行 log-rank 检验。P<0.05 被认为具有统计学显著性。具体的样本量（n 值）和 P 值已在相应图例中注明。

### 3.结果

#### 3.1 蛋氨酸代谢通路在甲流病毒感染过程中活化

为明确甲型流感病毒对人原代Ⅱ型肺泡上皮细胞（human primary alveolar type 2 epithelial cells, hpAT2EC）的感染特性，本研究首先建立体外细胞感染模型。采用携带绿色荧光蛋白标记的重组甲型流感病毒（IAV-GFP）感染 hpAT2EC，感染复数（multiplicity of infection, MOI）为 1，分别于感染 0、4、8 小时（hrs）收集细胞，流式细胞术检测 GFP 阳性细胞比例，定量分析病毒对靶细胞的感染效率。流式检测结果表明：感染 4 小时后，hpAT2EC 的 GFP 阳性率可达 13.2%-15.9%；感染 8 小时细胞感染阳性率升高至 27.8%-29.7%，随感染时间延长，病毒感染细胞比例呈显著上升趋势（图 5A, B）。上述结果提示，MOI=1 条件下 IAV-GFP 能够有效感染 hpAT2EC，该体外感染模型稳定可靠，可用于后续细胞层面抗病毒效应及相关研究。

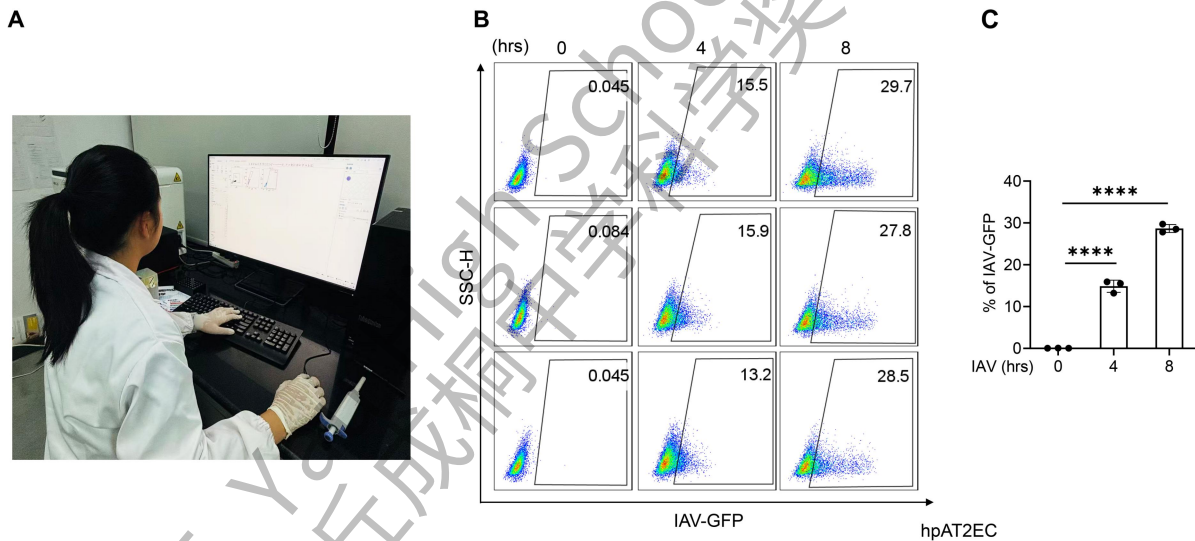


图 5. IAV-GFP 感染 hpAT2EC 细胞模型。A,B: 流式检测 IAV-GFP 对 hpAT2EC 细胞的感染效率；C: 统计分析不同时间下 IAV-GFP 的感染效率。\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ，具有显著统计学意义。

为进一步探究甲型流感病毒感染对细胞代谢稳态的影响，本研究以 MOI=1 的条件对细胞进行 IAV 感染 8 小时处理，并开展代谢组学测序分析(图 6A)。通过 MetaboAnalyst 在线软件对 IAV 感染前后的细胞进行代谢主成分分析（Principal Component Analysis, PCA），结果显示，两组样本在主成分空间中明显分离，提示 IAV 感染可引起 hpAT2EC 宿主细胞发生整体代谢重塑（图 6B）。

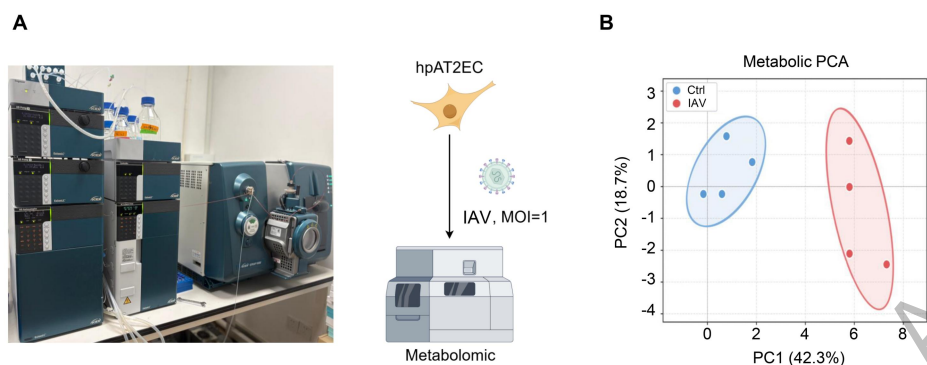


**图 6. IAV 感染诱导细胞代谢重塑。** A: 代谢组学检测技术平台与实验流程示意图，采用 MOI=1 的 IAV 毒株感染 hpAT2EC 细胞，8 小时收集样本后进行代谢组学分析；B: MetaboAnalyst 在线软件分析胞内代谢主成分。

为明确 IAV 感染调控宿主细胞的核心代谢通路，本研究利用 MetaboAnalyst 在线软件对筛选得到的差异代谢物进行 KEGG 代谢通路富集分析。结果显示，IAV 感染可导致宿主胞内多条代谢通路发生显著改变；在所有差异通路中，蛋氨酸代谢通路（Methionine metabolism）的富集因子最高且显著性最强（图 7A）。进一步针对氨基酸代谢通路富集分析，结果显示蛋氨酸代谢、苯丙氨酸代谢以及丝氨酸/苏氨酸代谢高度富集（图 7B）。利用联川云平台对差异代谢物的火山图分析进一步揭示，相较于对照组，蛋氨酸代谢通路的关键核心代谢物 S-腺苷甲硫氨酸（SAM）显著上调，但下游代谢物 SAH 没有显著性差别（图 7C）。同时，ELISA 检测 hpAT2EC 细胞中 SAM 水平变化，进一步明确 IAV 病毒感染诱导胞内 SAM 显著升高（图 7D）。上述结果表明，IAV 感染重塑并激活宿主细胞的蛋氨酸代谢通路，诱导核心代谢中间体 SAM 的异常积累。

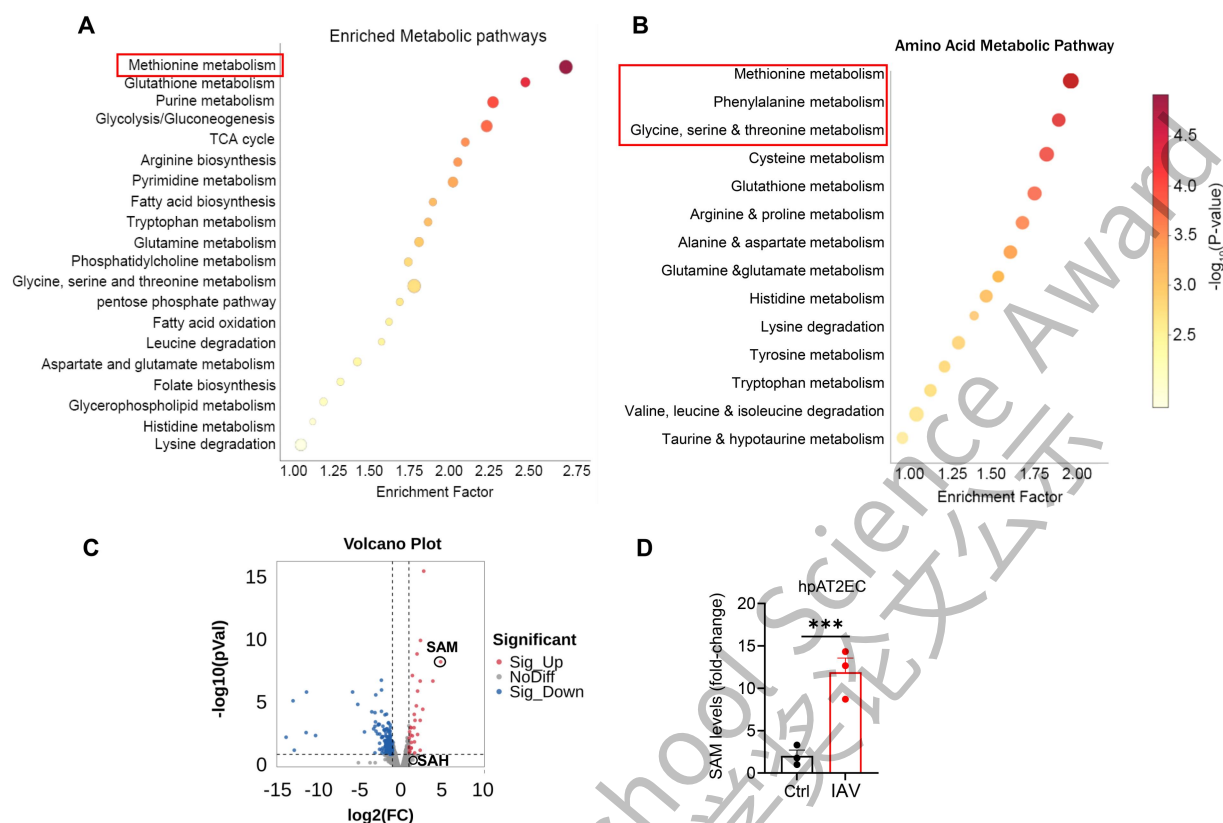


图 7. IAV 感染活化蛋氨酸代谢通路。A, B: 代谢通路富集分析; C: 差异代谢物火山图分析; D: ELISA 检测 hpAT2EC 细胞 SAM 水平。\*\*\*:  $P < 0.001$ , 具有显著统计学意义。

### 3.2 蛋氨酸调控 IAV 感染

作为体内无法自主合成、必须由食物供给的营养素，必需氨基酸（Essential Amino Acids, EAAs）如蛋氨酸（Methionine）、缬氨酸（Valine），异亮氨酸（Isoleucine），亮氨酸（Leucine），苯丙氨酸（Phenylalanine），色氨酸（Tryptophan），赖氨酸（Lysine）及苏氨酸（Threonine），不仅是蛋白翻译与组织修复的基石，且在宿主免疫应答与病原体复制的博弈中发挥重要作用。

为了明确饮食中氨基酸干预对宿主抗病毒免疫及感染病程的具体影响，本研究在小鼠经滴鼻感染 IAV 后第 2 天（2 dpi），分别给予正常饮食（CD）、低蛋白饮食（LPD），以及在 LPD 基础上分别回补富集分析排名前列的必需氨基酸（蛋氨酸 Met、苯丙氨酸 Phe、苏氨酸 Thr）（图 7B），实验期间每日记录小鼠体重变化与生存状态，整体观察周期持续至感染后第 14 天（14 dpi）。并在感染后第 5 天（5 dpi）处死部分小鼠并采集肺组织标本，用于后续病理损伤评估、病毒相关基因检测（图 8A）。结果显示，与 CD

组相比，LPD 组小鼠终点生存率由 20% 升至 80%，且体重下降幅度较小（图 8B、C）。进一步的氨基酸回补实验表明，补充蛋氨酸（LPD+Met）可逆转 LPD 的保护效应，显著加重流感病毒感染所致的小鼠死亡率和体重降低；而回补苯丙氨酸（LPD+Phe）或苏氨酸（LPD+Thr）小鼠的生存率及体重变化与 LPD 组相比无显著差异（图 8B、C）。

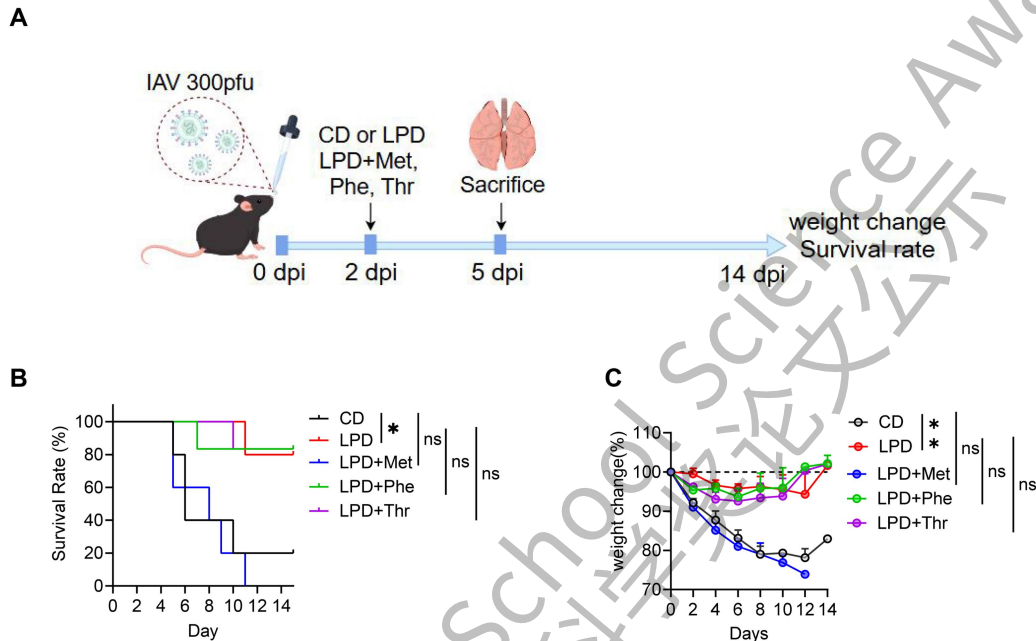


图 8. 补充蛋氨酸促进 IAV 感染。A：小鼠经鼻腔滴注 300 PFU IAV 建立呼吸道感染模型，于感染后 2 天分别给予正常对照饮食（CD）或低蛋白饮食（LPD）并回补不同必需氨基酸（Met，Phe，Thr）干预，监测小鼠体重变化与生存率。B：小鼠生存率；C：小鼠体重变化；每组  $n=5$ ，\*： $P<0.05$ ，\*\*： $P<0.01$ ，具有显著统计学意义，ns：无显著差异。

为进一步评估不同饮食干预对 IAV 感染小鼠肺部病理损伤及病毒相关基因表达的影响，本研究对各组小鼠肺组织进行了病理学分析（H&E 染色）与病毒基因表达检测（图 9）。肺组织 H&E 染色显示，CD 组小鼠肺组织呈现严重的炎性细胞浸润、肺泡间隔增厚及结构破坏，而 LPD 干预可显著减轻肺部病理损伤（图 9A，B）。氨基酸回补实验表明，补充蛋氨酸（LPD+Met）促进了肺组织病变；而补充苯丙氨酸（LPD+Phe）或苏氨酸（LPD+Thr）组的肺部组织形态与病理评分与 LPD 组相比无明显差异（ns，图 9A，B）。

同时，取小鼠肺组织研磨后进行荧光定量 PCR(qPCR)，分析小鼠肺组织 IAV 基因 NSI 的表达水平。结果显示，LPD 可显著降低 IAV 基因 NSI mRNA 水平（图 9C）。在

LPD 的基础上回补蛋氨酸 (LPD+Met) 导致 *NSI* mRNA 水平显著升高; 而回补苯丙氨酸 (LPD+Phe) 或苏氨酸 (LPD+Thr) 与 LPD 组无显著差异 (图 9C)。ELISA 结果显示, 低蛋白饮食显著降低了小鼠肺组织中 SAM 水平, 而补充蛋氨酸可恢复组织中 SAM 水平, 补充 Phe 与 Thr 不影响小鼠肺组织中 SAM 水平 (图 9D)。上述结果表明, 限制蛋氨酸摄入并减少 SAM 合成, 可能是低蛋白饮食减轻 IAV 诱导肺部损伤及抑制病毒复制的重要因素。

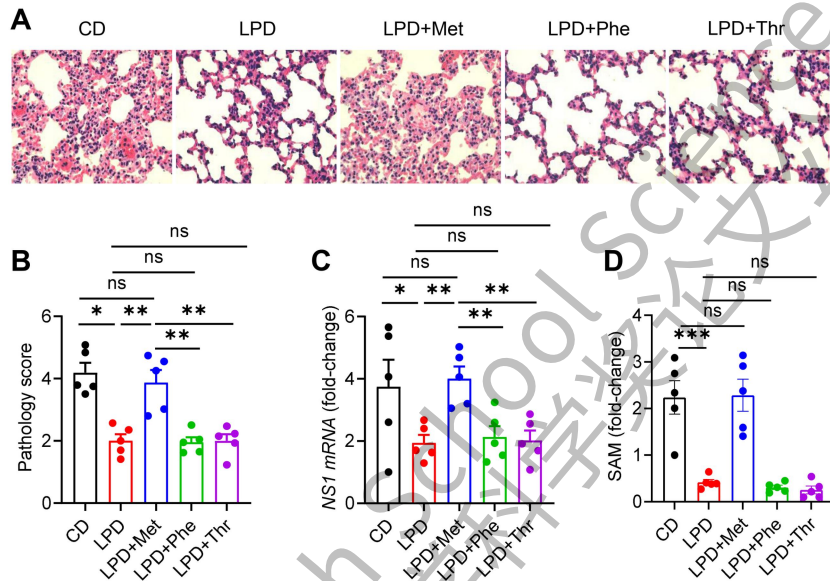


图 9. 补充蛋氨酸促进 IAV 感染小鼠肺组织病理损伤与病毒相关基因表达。A: 小鼠肺组织 HE 染色 ( $\times 200$ ); B: 肺组织病理评分; C: 小鼠肺组织中 IAV 病毒基因 *NSI* 的 mRNA 相对表达水平; D: 小鼠肺组织中 SAM 水平。n=5 per group, \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ , 具有显著统计学意义, ns: 无显著差异。

### 3.3 蛋氨酸限制抑制 IAV 感染

为进一步探究蛋氨酸代谢在病毒感染中的作用, 本研究于流感病毒感染 2 天后将小鼠随机分为两组, 分别进行正常对照饮食 (CD, 含 0.85% 的蛋氨酸) 与蛋氨酸限制性饮食 (methionine restriction diet, MRD, 含 0.17% 的蛋氨酸) 喂养 (图 10A)。结果显示, 相较于 CD 组, MRD 干预可减缓 IAV 诱导的小鼠体重下降 (图 10B), 并提升了 IAV 感染小鼠的生存率, 终点生存率由 15% 升至约 80% (图 10C)。

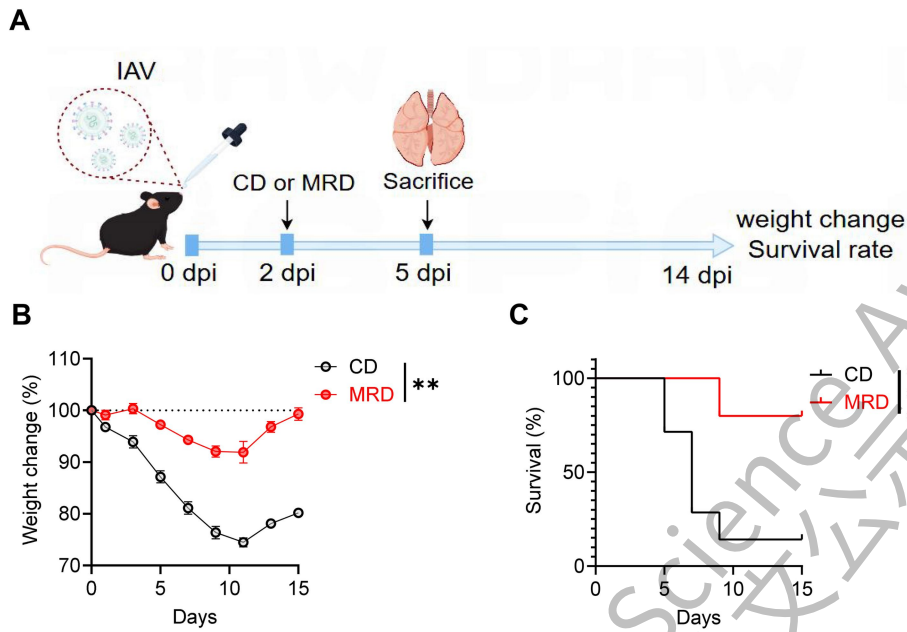
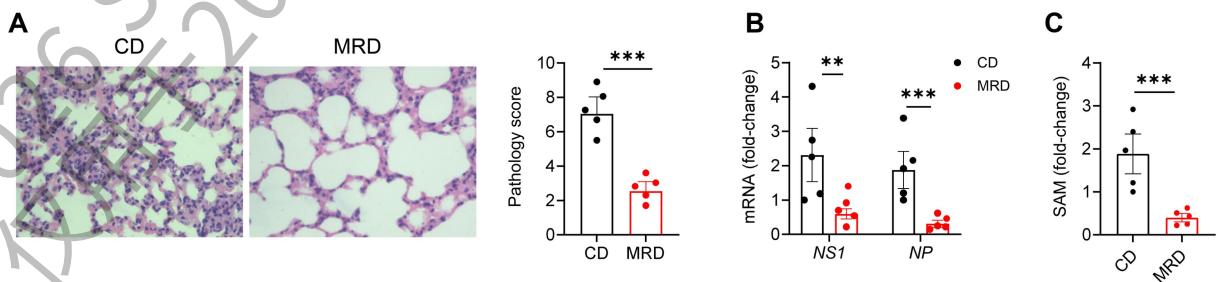


图 10. 蛋氨酸限制性饮食抑制 IAV 感染。A: 小鼠经鼻腔滴注 300 PFU IAV 建立呼吸道感染模型，于感染后 2 天分别给予正常对照饮食 (CD) 或蛋氨酸限制性饮食 (MRD) 干预。B: 小鼠感染后体重变化曲线。C: 小鼠感染后生存曲线。n=5 per group, \*\*:  $P<0.01$ , \*\*\*:  $P<0.001$ , 具有显著统计学意义。

观察急性期小鼠肺组织损伤程度与炎细胞浸润情况发现，相较于对照组，MRD 喂养的小鼠肺组织损伤更轻，肺泡更完整，炎细胞浸润减少 (图 11A, 左)。对肺组织病理损伤进行评分分析，结果显示 MRD 组的病理评分显著低于 CD 组 (图 11A, 右)。qPCR 结果显示小鼠肺组织 IAV 基因 (*NS1/NP*) 的 mRNA 显著降低 (图 11B)；而肺组织中 SAM 的水平也明显下降 (图 11C)。这些结果表明蛋氨酸限制饮食具有抗病毒保护作用。

图 11. 蛋氨酸限制性饮食减轻 IAV 感染小鼠肺组织病理损伤并抑制病毒相关基因表达。A: 小鼠肺



组织 HE 染色 ( $\times 200$ )，左；肺组织病理评分，右；B: 小鼠肺组织中 IAV 病毒基因 *NS1* 与 *NP* 的

mRNA 相对表达水平；C：ELISA 检测小鼠肺组织中 SAM 水平。n=5 per group, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001, 具有显著统计学意义, ns: 无显著差异。

随后本研究在体外细胞实验中进一步验证蛋氨酸限制对 IAV 感染的影响, 本研究用蛋氨酸缺乏的培养基 (MetR) 预处理 hpAT2EC 细胞 1 小时, IAV-GFP 病毒感染后 8 小时, ELISA 检测细胞 SAM 水平, 荧光显微镜观察与流式细胞术检测病毒感染情况。相较于完全培养基 (complete medium, CM) 组, MetR 组的 SAM 水平显著下降(图 12A), GFP 阳性细胞数量显著减少 (图 12B-D)。

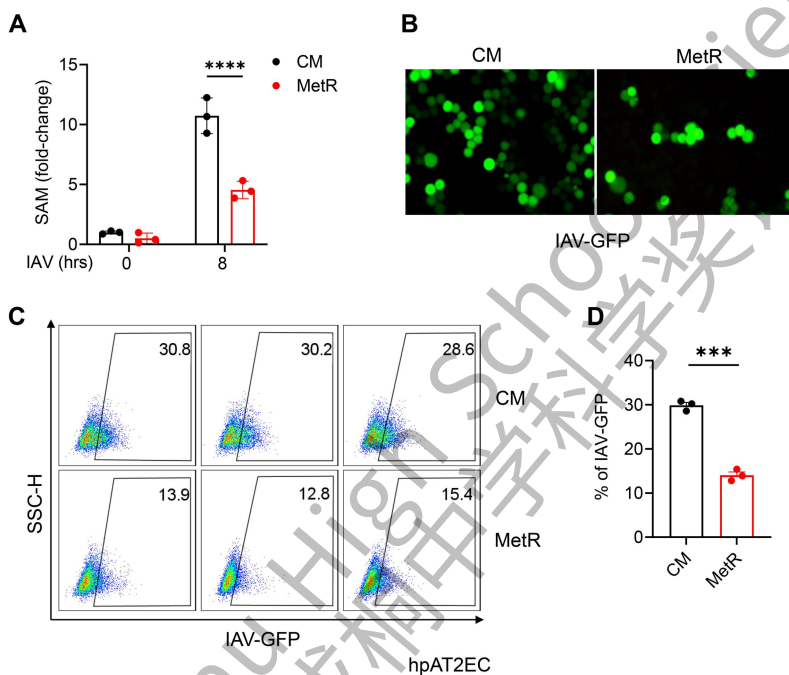


图 12. 蛋氨酸限制抑制 IAV-GFP 感染。A: ELISA 检测胞内 SAM 水平; B: 荧光显微镜观察 IAV-GFP 感染阳性的 hpAT2EC 细胞; C, D: 流式细胞术检测细胞感染效率。\*\*\* P<0.001, \*\*\*\* P<0.0001 具有显著统计学意义。

同时, 本研究用实时荧光定量 PCR 检测病毒相关基因及宿主抗病毒固有免疫关键分子的表达变化。结果显示, MetR 显著降低 IAV 基因 *NSI* 与 *NP* 的 mRNA 水平 (图 13A、B), 并促进 I 型干扰素 (*IFN-β*) 与干扰素刺激基因 *ISG15* 的表达 (图 13C、D)。上述结果表明, 胞内 SAM 代谢稳态是调控机体抗病毒免疫应答和甲型流感感染进程的重要代谢因素之一。

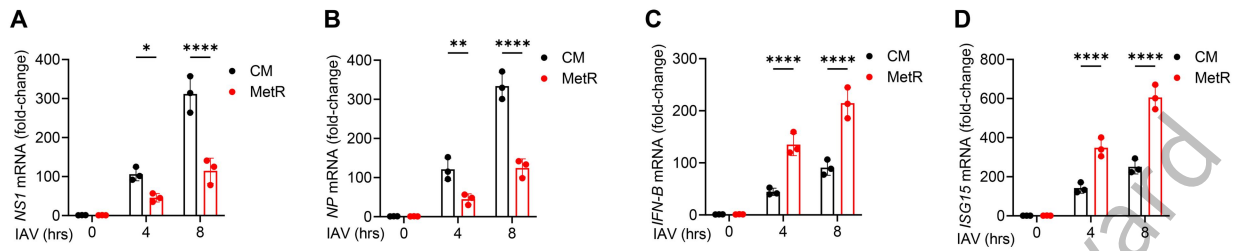


图 13. 蛋氨酸限制促进抗病毒固有免疫。A, B: IAV 病毒基因 *NSI* (A) 与 *NP* (B) 的 mRNA 相对表达水平; C, D: 宿主抗病毒固有免疫关键分子 *IFN-β* (C) 与 *ISG15* (D) 的 mRNA 相对表达水平。

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , 具有显著统计学意义。

### 3.4 ODR4 响应 SAM 水平波动表达上调

接下来, 本研究探讨细胞是否存在响应病毒感染过程中 SAM 代谢稳态变化的防御机制。为筛选响应 SAM 水平变化的关键调控分子, 本研究用 SAM (50  $\mu$ M) 处理 hpAT2EC 细胞 8 小时后进行 RNA 测序, 利用联川云平台在线软件分析差异表达基因。在显著变化的基因中, ODR4 (odr-4 GPCR localization factor homolog) 上调最为明显 (图 14A, B)。Western Blot 实验进一步证明 SAM 上调 ODR4 蛋白表达, 但下游代谢物 S-腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosyl-L-homocysteine, SAH, 50  $\mu$ M) 没有此效应 (图 14C)。

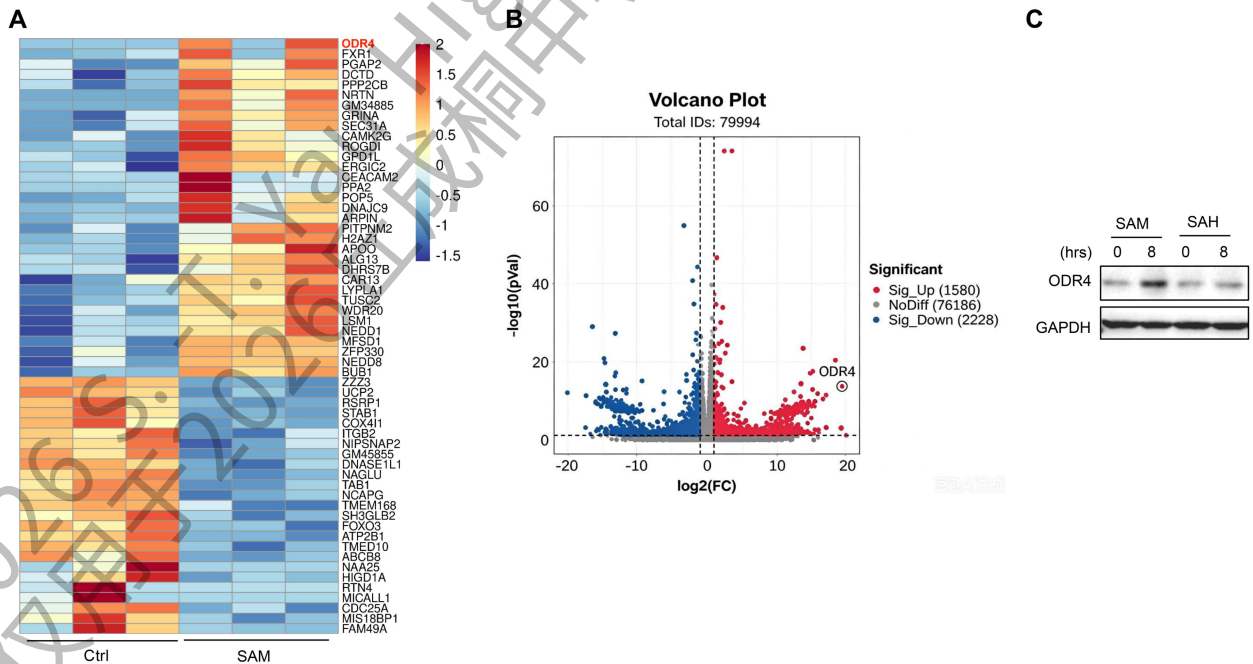


图 14. SAM 上调 ODR4 分子表达。A: 差异表达基因热图分析; B: 差异表达基因火山图; C: Western Blot 检测 SAM 与 SAH 分别刺激后胞内 ODR4 表达水平。

ODR4 是进化上高度保守的内质网定位蛋白，帮助 GPCR 在细胞内的正确定位<sup>[24]</sup>。为系统明确 ODR4 在人体与小鼠上皮组织中的表达分布特征，本研究利用公共数据库（The Human Protein Atlas 与 BioGPS）对其转录组表达谱进行了生物信息学分析。数据分析结果显示，*ODR4/Odr4* 在人体及小鼠的多种上皮组织中均呈现广泛表达。在人上皮组织中，*ODR4* 表达量整体处于较高水平，其中在肺组织（Lung）中的表达水平最高（图 15A）；在小鼠上皮组织中，胃、小肠以及呼吸道上皮（肺、支气管、气管）中均维持着较高的 *ODR4* 表达丰度（图 15B）。

上述结果表明，ODR4 在跨物种的上皮组织（尤其是呼吸道及消化道黏膜上皮）中具有高度保守且广泛的表达分布，提示其可能作为基础代谢或生理功能调控分子，在屏障组织的稳态维持与抗病毒应答中发挥作用。

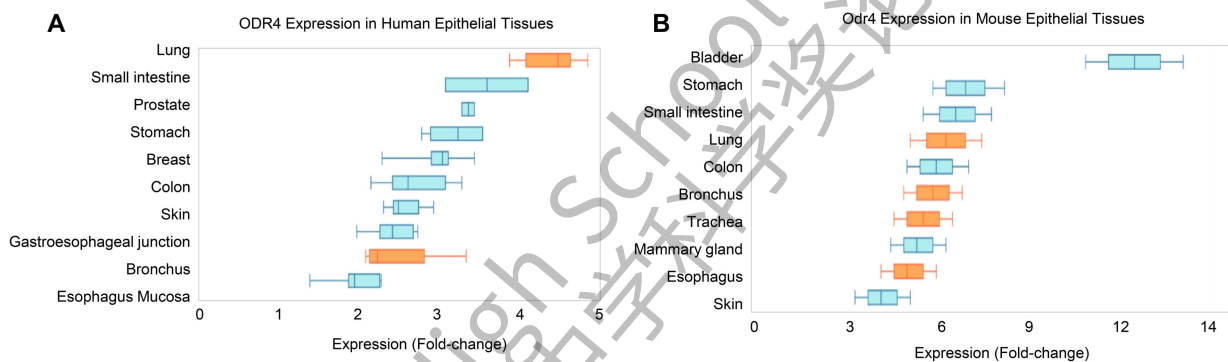


图 15. ODR4 在人体与小鼠上皮组织中表达谱。A: *ODR4* 在人体各上皮组织中的 mRNA 表达水平；B: *Odr4* 在小鼠各组织中的 mRNA 表达水平。数据分别来源于 Human Protein Atlas 与 BioGPS 数据库。

为进一步验证病毒感染过程中 ODR4 的表达变化，本研究对病毒感染后 5 天小鼠的肺组织进行荧光定量 PCR 与免疫组化分析（IHC）。相较于未感染组（Ctrl），qPCR 结果显示流感模型小鼠肺组织中 *ODR4* 表达水平显著升高（图 16A），免疫组化检测也得到一致结果（图 16B）。细胞实验结果进一步证明 IAV 感染促进 ODR4 的 mRNA 和蛋白表达（图 16C, D）。

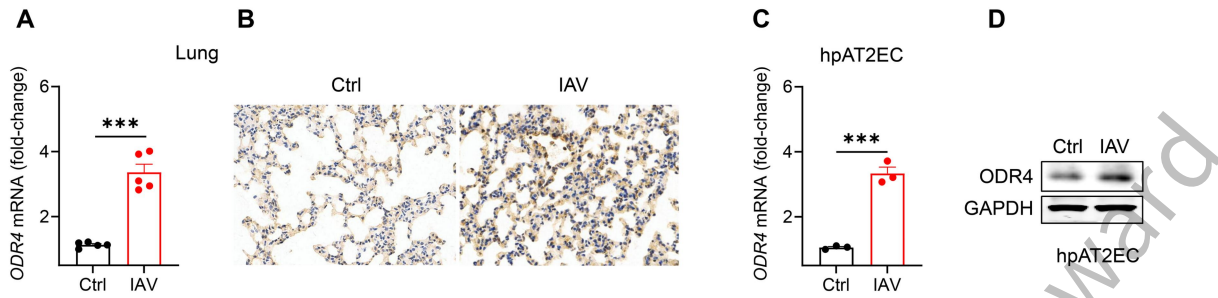


图 16. IAV 感染诱导 ODR4 表达上调。A: 小鼠肺组织中 *ODR4* 的 mRNA 相对表达水平; B: 小鼠肺组织 ODR4 免疫组化染色代表性结果 ( $\times 200$ ),  $n=5$  per group; C: hpAT2EC 细胞中 *ODR4* 的 mRNA 相对表达水平; D: hpAT2EC 细胞中 ODR4 的蛋白表达水平。\*\*\*  $P<0.001$ , 具有显著统计学意义。

为进一步探究 ODR4 是否响应 IAV 感染诱导 SAM 波动而表达上调,本研究利用 SAM 合成酶抑制剂 (AG270,  $50 \mu\text{M}$ ) 预处理 hpAT2EC 细胞 1 小时,抑制 SAM 的合成。并在不同感染时间点检测细胞内 ODR4 在转录与蛋白水平的表达变化 (图 17A、B)。qPCR 分析显示,IAV 感染可显著诱导 *ODR4* mRNA 表达,而 AG270 处理后,IAV 感染诱导的 *ODR4* 转录上调被显著减弱 (图 17A)。Western Blot 检测进一步证实, AG270 处理能够有效阻断 IAV 感染引起的 ODR4 蛋白表达上调 (图 17B)。上述结果表明, ODR4 响应 IAV 感染诱导的蛋氨酸代谢重塑而表达上调,提示该分子可能参与病毒感染过程中的宿主防御应答。

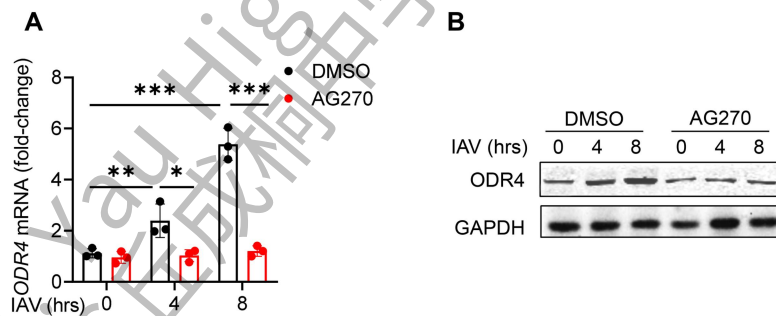


图 17. IAV 感染诱导的 ODR4 表达上调依赖于胞内 SAM。A: qPCR 检测 *ODR4* mRNA 水平; B: Western Blot 检测 hpAT2EC 细胞中 ODR4 蛋白的表达水平。\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ , 具有显著统计学意义。DMSO 作为溶剂对照。

### 3.5 ODR4 抑制病毒感染并促进抗病毒免疫应答

为了进一步阐明 ODR4 在抗病毒感染中的功能,本研究首先构建了 ODR4 敲降 (siODR4) hpAT2EC 细胞 (图 18A)。IAV-GFP 分别感染对照组 (siNC, 无关序列) 与 ODR4 敲降组细胞 (siODR4) 8 小时。荧光显微镜结果显示,与对照组相比, siODR4 组细

胞中绿色荧光阳性细胞数量显著增多（图 18B），流式细胞术检测结果进一步证实，敲降 ODR4 可显著促进 IAV 感染 hpAT2EC 细胞，相较于 siNC 组，感染阳性细胞比例从 27% 升至 54.8% 左右（图 18C，D）。

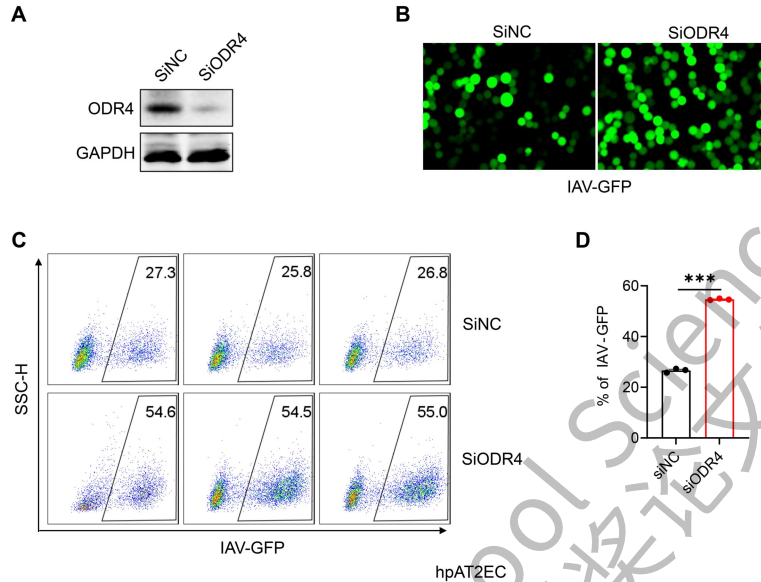


图 18. 敲降 ODR4 促进 IAV 感染 hpAT2EC 细胞。A: Western Blot 检测 ODR4 的敲降效率；B: 荧光显微镜观察 IAV-GFP 感染情况；C, D: 流式细胞术检测细胞感染情况。\*\*\*  $P < 0.001$ ，具有显著统计学意义。

为进一步明确 ODR4 调控 IAV 感染的作用机制，本研究通过实时荧光定量 PCR 检测病毒相关基因表达及宿主固有免疫应答强度。检测结果证实 ODR4 敲降显著升高 IAV 基因 *NSI* 与 *NP* 的转录水平（图 19A），并抑制宿主抗病毒固有免疫关键分子 *IFN-β* 与 *ISG15* 表达（图 19B）。以上结果表明，ODR4 可能是宿主响应 IAV 感染过程中 SAM 代谢动态变化的关键效应分子，在机体抗 IAV 防御应答中发挥调控作用。

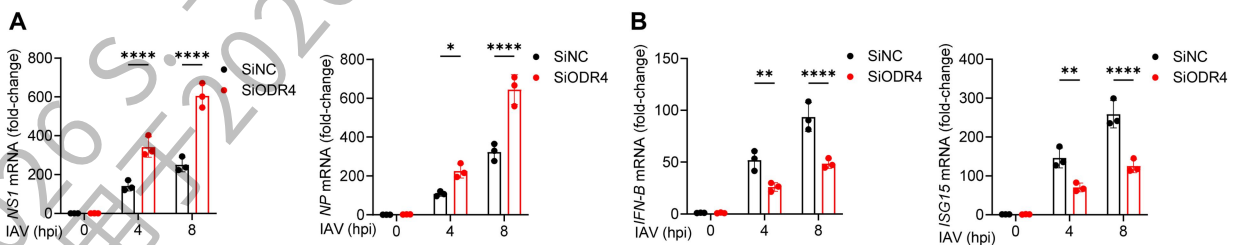


图 19. 敲降 ODR4 抑制抗病毒固有免疫，促进 IAV 感染。A: IAV 病毒基因 *NSI* 与 *NP* 的 mRNA 相对表达水平；B: *IFN-β* 与 *ISG15* 的 mRNA 相对表达水平。\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ ，\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ，具有显著统计学意义。

## 4. 讨论

甲型流感病毒感染可重塑宿主细胞代谢网络,构建利于自身复制的胞内微环境;同时,宿主可响应感染相关的代谢变化并启动免疫防御<sup>[13]</sup>。病毒与宿主的代谢免疫博弈,影响感染进程与疾病预后<sup>[13]</sup>。本研究的代谢组学结果显示,IAV 感染可显著激活肺泡上皮细胞蛋氨酸代谢通路,导致代谢产物 SAM 水平升高。体内外干预实验观察到,蛋氨酸限制可下调胞内 SAM 水平,增强 I 型干扰素介导的固有免疫应答,有效抑制 IAV 感染、减轻肺部病理损伤并提升感染小鼠存活率;反之,补充蛋氨酸可上调 SAM 水平,显著促进 IAV 感染进程。以上结果表明, SAM 参与调控甲型流感感染进程,但其因果作用仍需进一步验证。需要指出的是, NS1/NP 的 qPCR 结果反映病毒相关 RNA 水平,不能直接等同于感染性活病毒滴度。

本研究进一步观察到, IAV 感染和 SAM 处理均能诱导 ODR4 表达上调,而抑制 SAM 合成则可阻断 IAV 介导的 ODR4 表达上调。敲降 ODR4 后, IAV 感染增多,并伴随 *IFN- $\beta$* 、*ISG15* 等抗病毒基因表达下降。这些结果提示, ODR4 可能作为蛋氨酸代谢响应分子参与宿主抗病毒固有免疫应答。综合体内外实验结果,本研究初步建立了蛋氨酸代谢-SAM-ODR4-固有免疫调控模型。这一调控模型提示,病毒诱导的蛋氨酸代谢重塑不只是感染伴随现象,而是参与宿主与病毒博弈的相互调节。同时,蛋氨酸限制性饮食在本研究小鼠模型中呈现保护效应,为后续研究代谢靶向的营养干预提供了思路,但尚不能直接外推至人群或其他呼吸道病毒感染。

本研究的主要创新点在于,初步发现内质网膜蛋白 ODR4 可能连接蛋氨酸代谢与宿主抗病毒固有免疫调控。ODR4 主要介导 G 蛋白偶联受体的折叠与转运,维持细胞信号稳态<sup>[24]</sup>;另一方面可通过结合 de-UFMylation 酶 UFSP2,调控内质网蛋白的 UFMylation 修饰动态平衡<sup>[26]</sup>。本研究观察到, ODR4 敲降伴随固有免疫相关分子表达下降。结合 ODR4 的已知生物学功能,本研究推测其可能通过两条途径调控 I 型干扰素通路:一是调控特定 GPCR 的转运,介导下游信号变化;二是通过 UFSP2-UFMylation 相关机制影响 RIG-I 信号通路。上述机制目前仍属于工作假说,需通过 ODR4 过表达、通路活性检测及蛋白互作等实验进一步验证。

同时,本研究仍存在诸多局限性。首先, SAM 介导 ODR4 表达上调的具体分子机制尚未阐明。SAM 作为体内核心甲基供体,是否通过启动子甲基化、组蛋白甲基化等表观遗传修饰激活 ODR4 转录,仍需后续分子生物学实验加以验证。其次,本研究仅观察到

ODR4 敲低抑制抗病毒固有免疫应答，但其具体分子机制尚不明确。此外，低蛋白饮食和蛋氨酸限制可能同时改变摄食量、体重及全身营养状态，现有设计尚不能完全排除这些混杂因素；部分实验样本量较小，且缺少病毒滴度等活病毒学评价指标。蛋氨酸限制的保护效应也仅在动物模型中得到验证，其适宜干预时机、安全有效剂量、长期代谢影响及人群适用性仍有待进一步研究。

综上，本研究在细胞和小鼠模型中观察到 IAV 感染相关的蛋氨酸代谢及 SAM 水平变化，并发现 ODR4 能够响应 SAM 水平表达上调，调控抗病毒固有免疫应答。据此，本研究初步提出以蛋氨酸代谢响应为核心的宿主抗病毒防御调控模型（图 20）。该模型不仅为甲型流感感染的代谢调控机制提供了实验依据，也为基于营养免疫的膳食干预策略提供理论参考，但蛋氨酸限制能否转化为安全有效的人群干预策略，仍有待更多研究加以验证。

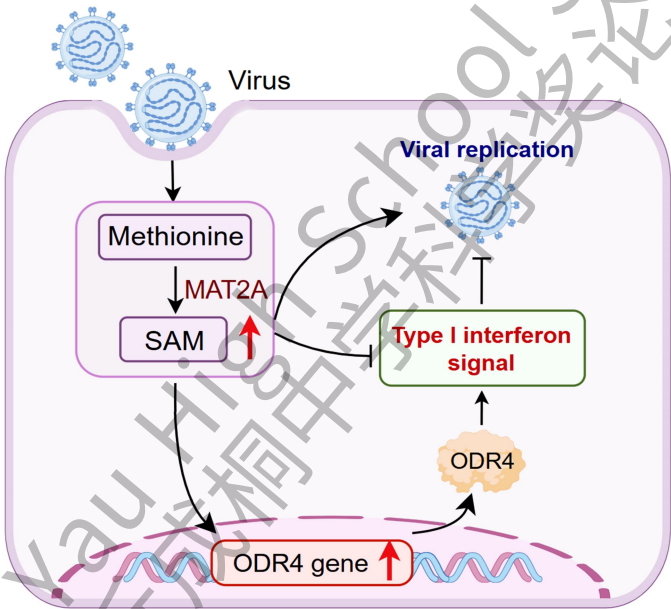


图 20: ODR4 响应病毒诱导蛋氨酸代谢重塑，调控抗病毒固有免疫

## 5.参考文献

- [1]. Dawood F S, Iuliano A D, Reed C, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: A modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012;12(9):687-695.
- [2]. Chinese National Influenza Center, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC. Chinese Weekly Influenza Surveillance Report. 2025. Available online: <https://ivdc.chinacdc.cn/cnic/>.
- [3]. Herold S , Becker C , Ridge K M ,et al.Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment[J].*European Respiratory Journal*. 2015; 45(5):1463.
- [4]. Lopez C E, Legge K L. Influenza A Virus Vaccination: Immunity, Protection, and Recent Advances Toward A Universal Vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2020 Aug 3;8(3):434.
- [5]. Thirumdas R, Kothakota A, Pandiselvam R, et al. Role of food nutrients and supplementation in fighting against viral infections and boosting immunity: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;110:552-563.
- [6]. Goldberg E L, Molony R D, Kudo E, et al. Ketogenic diet activates protective gamma-delta T cell responses against influenza virus infection. *Science Immunology*. 2019 Nov 15;4(41):eaav2026.
- [7]. Trompette A, Gollwitzer E S, Pattaroni C, Lopez-Mejia I C, Riya E, Pernot J, Ubags N, Fajas L, Nicod L P, Marsland B J. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c-Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8<sup>+</sup> T Cell Metabolism. *Immunity*. 2018;48(5):992-1005.e8.
- [8]. Gombart A F, Pierre A, Maggini S. A Review of Micronutrients and the Immune System-Working in Harmony to Reduce the Risk of Infection. *Nutrients*. 2020 Jan 16;12(1):236.
- [9]. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*. 2015 Feb;15(2):87-103.
- [10]. Monk P D, Marsden R J, Tear V J, et al. Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2021;9(2):196-206.
- [11]. Garcia-Sastre A. Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host & Microbe*. 2017;22(2):176.
- [12]. Tracy L, McGaha, et al. Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*. 2012;249(1):135-157.
- [13]. Xiao N , Nie M , Pang H ,et al.Integrated cytokine and metabolite analysis reveals immunometabolic reprogramming in COVID-19 patients with therapeutic implications[J].*Nature Communications*. 2021 Mar 12;12(1):1618
- [14]. Hafner A, Mokry R L, Purdy J G, Wobus C E. Metabolic hijackers: how viral proteins redefine host cell landscapes. *Journal of Virology*. 2026 Feb 17;100(2):e0055625.
- [15]. Zhao C, Ma Y, Zhang M, Gao X, Liang W, Qin Y, Fu Y, Jia M, Song H, Gao C, Zhao W. Polyamine metabolism controls B-to-Z DNA transition to orchestrate DNA sensor cGAS activity. *Immunity*. 2023;56(11):2508-2522.

- [16]. Steed A L, Christophi G P, Kaiko G E, et al. The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science*. 2017;357(6350):498.
- [17]. Swerczek T W. Scholarly Journal of Food and Nutrition Opinion Effect of Low Dietary Protein vs. High Protein Diets on COVID-19 Infection and Mortality. *Scholarly Journal Of Food And Nutrition*, 2020, 3 (4) : 387-389.
- [18]. Singh S, Kola P, Kaur D, et al. Therapeutic Potential of Nutraceuticals and Dietary Supplements in the Prevention of Viral Diseases: A Review. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8:679312.
- [19]. Sanderson S M, Gao X, Dai Z, et al. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nature Reviews Cancer*. 2019 Nov;19(11):625-637.
- [20]. Guo R, Liang J H, Zhang Y, et al. Methionine Metabolism Controls the B-cell EBV Epigenome and Viral Latency. *Cell Metabolism*. 2022 Sep 6;34(9):1280-1297.e9.
- [21]. Tsukamoto Y, Hiono T, Yamada S, et al. Inhibition of cellular RNA methyltransferase abrogates influenza virus capping and replication. *Science*. 2023;379(6632):586-591.
- [22]. Zhu J, Li X, Cai X, Zhou Z, Liao Q, Liu X, Wang J, Xiao W. Asymmetric arginine dimethylation of cytosolic RNA and DNA sensors by PRMT3 attenuates antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(36):e2214956120.
- [23]. Wang Z, Chen X, Zhu C, et al. Direct lysine dimethylation of IRF3 by the methyltransferase SMYD3 attenuates antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2025;122(3).
- [24]. Chen C, Itakura E, Weber K P, et al. An ER Complex of ODR-4 and ODR-8/Ufm1 Specific Protease 2 Promotes GPCR Maturation by a Ufm1-Independent Mechanism. *PLoS Genetics*. 2014;10(3):e1004082.
- [25]. Wang N, Huang H, Xiong Q, Chen N, Xi N, Wu P, Liu M, Qian M, Wang Q, Du B. GNAQ Negatively Regulates Antiviral Innate Immune Responses in a Calcineurin-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*. 2019 Sep 1;203(5):1288-1297.
- [26]. Mao G, Ito S, Ishimura R, Sakamaki JI, et al. The UFSP2-ODR4 complex spatially confines and dynamically controls UFM1 deconjugation to safeguard neuronal proteostasis. *Molecular Cell*. 2026 Aug 6;86(15):3035-3049.e8.
- [27]. Snider D L, Park M, Murphy K A, Beachboard D C, Horner S M. Signaling from the RNA sensor RIG-I is regulated by ufmylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Apr 12;119(15):e2119531119.

## 致 谢

季节性流感病毒持续高发，已经成为不容忽视的公共卫生问题。如 2024 年秋季流感高发，我和不少同学接连发烧咳嗽，班级里大面积请假，严重的时候学校临近临时停课。这不仅打乱同学们正常的学习节奏，还影响大家的身体健康。中国自古就讲民以食为天，受此启发，我开始思考能否从饮食角度探索流感的防控思路。2025 年初，我了解到浙江大学姚雨石教授课题组长期关注抗病毒免疫调控，经联系沟通后姚雨石教授愿意无偿为我提供学术指导，我也顺利进入课题组进行观摩学习。6 月，我正式开展实验，研究流感感染如何影响宿主代谢，探索有效的膳食干预方式以抵御呼吸道病毒感染，并且寻找感知代谢变化的关键分子，阐明其在抗病毒固有免疫中的作用。

在整个研究进程中，选题阶段我结合自身对膳食营养与免疫健康的兴趣提出初步探索设想，姚雨石教授从病毒免疫学与代谢调控的专业角度出发，与我共同确定核心研究方向，并确立了体内动物实验与体外细胞实验并行的技术路线。此外，我的实验工作还得到了课题组师兄师姐的帮助：刚开始动手做实验时，我的操作很不熟练，实验屡屡失败，还遇到过细胞污染的状况，而师兄师姐从实验规范和基础操作一步步带我练习，让我能够顺利完成各项实验与样本收集。后续出现了实验结果不佳的问题，但在他们的帮助下，我优化了实验条件，最终获得了稳定的实验结果。数据获取与分析阶段，我自主检索 BioGPS 等公共数据库获取相关组学数据，使用在线分析工具开展差异分析与通路富集的研究。论文撰写阶段，我负责实验结果整理、初稿撰写与图表绘制，姚雨石教授对论文逻辑框架、学术表述、机制讨论进行多轮细致修改，指导我规范学术写作范式，完善论文的表述。

在此我由衷感谢姚雨石教授全程无偿的悉心指导，从明确课题方向、设计技术路线到讲解理论知识，以及论文一遍遍的打磨，每一个环节都倾注了大量心血；感谢课题组各位师兄师姐在实验操作、技术难题以及数据分析，绘制机制图等无私帮助。最后特别感谢本次赛事组委会搭建的优质平台，让我作为一名中学生有机会接触前沿研究技术与理论知识，围绕感兴趣的方向开展探索，也为呼吸道病毒感染防控贡献自己的一份微薄力量。